

dr n. med. Patryk Lipiński,
prof. dr hab. n. med. Anna
Tylki-Szymańska ✉

Klinika Pediatrii, Żywienia i Chorób Metabolicznych, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa

https://doi.org/10.18388/pb.2020_306

✉ autor korespondujący: a.tylki@ipczd.pl

Słowa kluczowe: glikozylacja, wrodzone zaburzenia glikozylacji, N-glikanaza 1, deglikozylacja, wrodzone zaburzenie deglikozylacji

STRESZCZENIE

Deficyt N-glikanazy 1 stanowi jedyne opisane dotychczas wrodzone zaburzenie deglikozylacji, które do tej pory rozpoznano u 27 pacjentów, w tym 2 z Polski. Patogeneza deficytu N-glikanazy 1 pozostaje nieznana, jednakże główną rolę przypisuje się zaburzonemu procesowi degradacji białek zależnemu od retikulum endoplazmatycznego. Do najbardziej charakterystycznych objawów zalicza się opóźnienie rozwoju psychoruchowego, hiperkinetyczne ruchy mimowolne, brak/zmniejszone wydzielanie łez, a także podwyższoną aktywność aminotransferaz. Potwierdzenie rozpoznania wymaga identyfikacji wariantów patogennych w genie *NGLY1*.

DEFINICJA I PATOGENEZA WRODZONYCH ZABURZEŃ DEGLIKOZYLACJI

Glikozylacja jest najczęściej występującą potranslacyjną modyfikacją białek. W zależności od miejsca przyłączenia reszty cukrowej końcowym produktem reakcji są N-glikany (wiązanie glikozydowe między atomem azotu grupy amidowej reszty asparaginy (Asn) a N-acetyloglukozaminą (GlcNAc)) lub O-glikany (wiązanie glikozydowe między atomem tlenu grupy hydroksylowej reszty seryny (Ser) lub treoniny (Thr) z N-acetylogalaktozaminą (GalNAc)) [1-6].

Wrodzone zaburzenia glikozylacji (ang. *congenital disorders of glycosylation*, CDG) stanowią grupę chorób związanych z defektem glikozylacji białek/lipidów czy biosyntezy glikozylfosfatydyloinozytolu [1-6]. Od momentu opisu pierwszej choroby (deficyt fosfomannozazy 2, PMM2-CDG) w 1980 roku przez prof. Jaekena, zidentyfikowano ponad 130 różnych zaburzeń glikozylacji [4]. Glikozylacja ma kluczowe znaczenie dla wielu procesów biologicznych zachodzących w komórkach, stąd manifestacja kliniczna CDG jest heterogenna pod względem klinicznym [1-3]. Wspólną manifestacją większości CDG są zaburzenia neurologiczne, o różnej ekspresji, mogące obejmować upośledzenie rozwoju psychoruchowego, padaczkę, ataksję czy neuropatię obwodową [2-3]. Objawy ze strony przewodu pokarmowego obejmują najczęściej zajęcie wątroby (od podwyższenia aktywności aminotransferaz, aż po niewydolność wątroby), zaburzenia wchłaniania, przewlekłą biegunkę, niedobór masy ciała [2-3]. W niektórych zaburzeniach CDG, hepatomegalia i podwyższenie aktywności aminotransferaz, przebiegają bez zajęcia układu nerwowego, np. MPI-CDG (deficyt izomeryzy fosfomannozowej). Dla PMM2-CDG, stanowiącego najczęstsze zaburzenie glikozylacji, charakterystyczne jest nieprawidłowe rozmieszczenie tłuszczu w tkance podskórnej (obecność poduszeczek tłuszczowych), obecność wklęsłych sutków czy dysmorfia twarzy (wydatna żuchwa, duże, nisko osadzone uszy) [2-3]. CDG mogą być przyczyną nieimmunologicznego obrzęku płodu, zwłaszcza PMM2-CDG, czy mniej częste ALG9-CDG, ALG8-CDG, MGAT2-CDG, COG6-CDG [7]. Tendencja do zakrzepicy występuje zwłaszcza w PMM2-CDG, MPI-CDG czy ALG1-CDG. Dla niektórych CDG charakterystyczne są także zaburzenia odporności, np. ATP6AP2-CDG; obecność *cutis laxa*, np. ATP6V0A2-CDG, ATP6V1A, ATP6V1E1 i ATP6AP2-CDG [2-3].

Markerem diagnostycznym większości zaburzeń N-glikozylacji jest nieprawidłowy profil izoform transferyny oznaczanych ilościowo metodą elektroogniskowania [5]. Podwyższenie frakcji asjalo- i disjalo-transferyny, wraz z obniżeniem frakcji tetrasjalo-transferyny jest charakterystyczne dla defektów wczesnych etapów N-glikozylacji (CDG typu I, poprzednia klasyfikacja CDG). Podwyższenie frakcji trisjalo- i monosjalo-transferyny wskazuje na defekty N-glikozylacji terminalnej (CDG typu II). Zaburzenia O-glikozylacji charakteryzują się hipoglikozylacją apolipoproteiny CIII (apo-CIII). Obniżenie glikozylacji transferyny występuje również w innych wrodzonych wadach metabolizmu – galaktozemii i fruktozemii, jednakże są to zaburzenia przejściowe, które obserwuje się w czasie ekspozycji na fruktozę czy galaktozę [8].

W odróżnieniu od glikozylacji, przebieg i znaczenie procesu deglikozylacji nie zostały dobrze poznane. Deficyt N-glikanazy 1 (ang. *NGLY1 deficiency*) [OMIM 615273] stanowi jedyne opisane dotychczas wrodzone zaburzenie deglikozylacji (ang. *congenital disorder of deglycosylation, CDDG*) [12].

N-glikanaza 1 (NGLY1) [EC 3.5.1.52], zwana także jako Peptydylo-N⁴-(N-acetylo-β-glukozamino)-aspraginoamidaza lub cytozolowa PNGaza (Peptydylo-N-Glikoamidaza) jest enzymem de-N-glikozylującym, katalizującym hydrolizę wiązania amidowego między N-aminoglikozidem N-acetyloglukozaminy (GlnNAc) redukującego końca oligosacharydu a atomem azotu grupy amidowej reszty asparaginy (Asn) wbudowanej w łańcuch polipeptydowy glikoproteiny [9-10]. Sumaryczne równanie reakcji katalizowanej przez NGLY1 przedstawia się następująco:



Cytozolowa PNGaza została po raz pierwszy zidentyfikowana w komórkach ssaków w 1993 roku i różni się właściwościami enzymatycznymi od pozostałych peptydylo-N-glikozydaz, m.in. PNGazy A opisaney w 1977 roku (źródło: wodny wyciąg migdałów) oraz PNGazy F (źródło: przesącz z *Flavobacterium meningosepticum*) [11].

N-glikanaza 1 kodowana jest przez gen *NGLY1*, który położony jest na krótkim ramieniu 3. chromosomu (3p24.2) i składa się z 12 egzonów zawierających 70kbp. Patogeneza deficytu N-glikanazy 1 pozostaje nieznana, jednakże główną rolę przypisuje się zaburzonemu procesowi degradacji białek zależnemu od retikulum endoplazmatycznego (ang. *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation, ERAD*) [10-11]. Proces ERAD jest częścią systemu kontroli jakości fałdowania białek w siateczce śródplazmatycznej i odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy wewnątrzkomórkowej. W przypadku deficytu *NGLY1*, najbardziej szkodliwy wpływ dla organizmu odgrywa ENGaza (Endo-N-acetylo-β-D-Glukozaminidaza) [EC 3.2.1.96], która oddziałuje na nieprawidłowo sfałdowane białka, prowadząc do ich akumulacji w siateczce śródplazmatycznej [10-11]. ENGaza jest lizosomalną hydrolazą, katalizuje reakcję:



OBRAZ KLINICZNY I BIOCHEMICZNY WRODZONYCH ZABURZEŃ DEGLIKOZYLACJI

Do najbardziej charakterystycznych cech/objawów klinicznych i biochemicznych *NGLY1-CDDG* zalicza się: opóźnienie rozwoju psychoruchowego, hiperkinetyczne ruchy mimowolne, brak/zmniejszone wydzielanie łez, a także podwyższoną aktywność aminotransferaz (Tabela 1) [13].

Opisywane u pacjentów z *NGLY1-CDDG* zaburzenia hiperkinetyczne obejmowały całe spektrum ruchów mimowolnych, m.in. dystonię, drżenie, mioklonie, ruchy płasawicze. U połowy pacjentów obserwowano także zaburzenia napadowe. Wyniki obrazowania mózgu metodą rezonansu

Tabela 1. Fenotyp kliniczny i biochemiczny pacjentów z *NGLY1-CDDG*.

Cecha	Liczba pacjentów	%
Opóźnienie rozwoju psychoruchowego	27/27	100
Brak lub zmniejszone wydzielanie łez	25/27	93
Hiperkinetyczne ruchy mimowolne	24/26	92
Podwyższona aktywność aminotransferaz	21/26	81

magnetycznego były niespecyficzne, najczęściej obserwowano postępującą atrofię mózgu i móżdżku. Niemowłeta/dzieci z *NGLY1-CDDG* były często opisywane jako hipotoniczne. Wraz z opóźnieniem rozwoju psychoruchowego obserwowano upośledzenie umysłowe w stopniu lekkim do znacznego.

U części pacjentów opisywano wewnątrzmaciczne opóźnienie wzrastania, znacznie częściej stwierdzano małągłowię oraz niedobór masy ciała i wzrostu nasilające się z wiekiem.

U większości pacjentów stwierdzano nieznacznie podwyższoną aktywność aminotransferaz w surowicy krwi. Heeley i wsp. przedstawili opis pacjenta, u którego biopsja wątroby wykonana w wieku 6 miesięcy wykazała cechy dokonanej marskości wątroby [15]. U jednego z pacjentów opisanych przez Lam i wsp. wykonano przeszczepienie wątroby w wieku 21 miesięcy z powodu raka wątrobowo-komórkowego w marskiej wątrobie [17]. U kilku pacjentów (w tym u jednego z Polski) wykazano obecność materiału amorficznego (w barwieniu metodą PAS o właściwościach podobnych do glikogenu) w cytoplazmie hepatocytów, odpowiadającego niezdegradowanym nieprawidłowo sfałdowanym glikoproteinom.

Pierwszy przypadek kliniczny *NGLY1-CDDG* opisano w 2012 roku; od tamtej pory rozpoznanie postawiono u 27 pacjentów, w tym 2 z Polski. Średni wiek pacjentów w momencie rozpoznania wynosił ok. 9 lat (zakres: 9 miesięcy – 26 lat). Większość wyników badań laboratoryjnych wykonywanych w ramach skriningu wrodzonych wad metabolizmu była prawidłowa (w tym izoformy transferyny metodą elektroogniskowania) lub wykazywała niespecyficzne odchylenia (np. nieznacznie podwyższone stężenie kwasu mlekowego w surowicy krwi obecne u niektórych pacjentów). Wszyscy dotychczas opisani pacjenci (poza jednym) zostali zdiagnozowani przy pomocy badania sekwencjonowania DNA (sekwencjonowanie następnej generacji obejmujące panel genów lub cały eksom) [12-22].

DIAGNOSTYKA WRODZONYCH ZABURZEŃ DEGLIKOZYLACJI

Na podstawie obserwacji polskich pacjentów oraz przeglądu piśmiennictwa zaproponowany został schemat diagnostyczny opracowany przez autorów [13]. *NGLY1-CDDG* należy rozważyć w diagnostyce pacjentów z opóźnieniem rozwoju psychoruchowego oraz hiperkinetycznymi ruchami mimowolnymi i/lub brakiem/zmniejszonym wydzielaniem łez. Obecność podwyższonej aktywności

aminotferaz w surowicy krwi dodatkowo przemawia za rozpoznaniem choroby.

NGLY1-CDDG należy również rozważyć w diagnostyce pacjentów z marskością wątroby o nieznannej etiologii, zwłaszcza u których w obrazie histopatologicznym biopatu wątroby obecna jest akumulacja substancji PAS-dodatniej (ang. *periodic acid-Schiff*, PAS) w obrębie cytozolu hepatocytów.

Potwierdzenie rozpoznania wymaga identyfikacji wariantów patogennych w genie *NGLY1*. Dzięki zastosowaniu metody sekwencjonowania nowej generacji badanie genomu człowieka może obejmować analizę całego genomu (ang. *whole genome sequencing*, WGS) lub dotyczyć mapowania zmian w sekwencji kodującej wszystkich genów, stanowiącej 2% genomu (ang. *whole exome sequencing*, WES), lub obejmować analizę wybranego panelu genów (od kilkudziesięciu do kilku tysięcy) [24]. Przesiewowy test molekularny wykorzystujący panel genów może być mniej kosztowną procedurą, umożliwiającą ustalenie rozpoznania w znacznie krótszym czasie, jednakże obecnie prowadzone są badania nad znalezieniem biomarkera dla NGLY1-CDDG [18,21]. Jedną z częściej opisywanych mutacji (30% pacjentów) jest mutacja typu *missense*, c.1201A>T (p.R401X); jej obecność na co najmniej 1 allelu może wiązać się z cięższym przebiegiem choroby [13].

Diagnostyka różnicowa NGLY1-CDDG obejmuje m.in. wrodzone zaburzenia glikozylacji (opóźnienie rozwoju psychoruchowego, manifestacja neurologiczna, ekspresja w obrębie wątroby), choroby mitochondrialne (manifestacja wielonarządowa), zaburzenia neurotransmisji (niespecyficzne odchylenia w badaniu płynu mózgowo-rdzeniowego), zespół „3A” (alacrimia).

ROKOWANIE, LECZENIE WRODZONYCH ZABURZEŃ DEGLIKOZYLACJI

Na chwilę obecną leczenie pacjentów z NGLY1-CDDG jest wyłącznie objawowe [12].

Rokowanie jest względnie dobre, spośród 27 opisanych pacjentów, trzech zmarło: jeden w wieku 5 lat w przebiegu stanu padaczkowego w trakcie infekcji wirusowej dróg oddechowych; drugi w wieku 9 miesięcy we śnie – bezpośrednio przyczyna zgonu nie jest znana; trzeci w wieku 16 lat z powodu przewlekłej niewydolności oddechowej związanej z częstymi infekcjami dróg oddechowych [12-22]. W stanach zwiększonego katabolizmu (gorączka, infekcja) pacjenci z NGLY1-CDDG są narażeni na ryzyko dekompensacji metabolicznej [13].

W 2013 roku powstała pierwsza fundacja/stowarzyszenie rodzin pacjentów z NGLY1-CDDG, Grace Science Foundation, której założycielami są rodzice Grace, jednej z pierwszych sześciu zdiagnozowanych pacjentów na świecie. W rejestrze pacjentów prowadzonym przez fundację znajduje się na chwilę obecną 54 pacjentów (informacja mailowa) z całego świata. Głównym priorytetem fundacji są badania nad możliwościami leczenia pacjentów z NGLY1-CDDG [23].

PODSUMOWANIE

Deficyt N-glikanazy 1 stanowi pierwsze dotychczas opisane wrodzone zaburzenie de-N-glikozylacji. Dzięki zastosowaniu metody sekwencjonowania nowej generacji, liczba zdiagnozowanych pacjentów wzrasta w ostatnich latach. Opóźnienie rozwoju psychoruchowego, hiperkinetyczne ruchy mimowolne, brak/zmniejszone wydzielanie łez, podwyższona aktywność aminotferaz w surowicy krwi należą do najbardziej charakterystycznych objawów klinicznych i biochemicznych choroby.

PIŚMIENNICTWO:

1. Cherepanova N, Shrimal S, Gilmore R (2016) N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 41: 57-65
2. Francisco R, Marques-da-Silva D, Brasil S, Pascoal C, Dos Reis Ferreira V, Morava E, Jaeken J (2019) The challenge of CDG diagnosis. *Mol Genet Metab* 126: 1-5
3. Péanne R, de Lonlay P, Foulquier F, Kornak U, Lefeber DJ, Morava E, Pérez B, Seta N, Thiel C, Van Schaftingen E, Matthijs G, Jaeken J (2018) Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? *Eur J Med Genet* 61: 643-663
4. Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E (1984) Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin Chim Acta* 144: 245-247
5. Lefeber DJ, Morava E, Jaeken J (2011) How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation. *J Inher Metab Dis* 34: 849-852
6. Verheijen J, Tahata S, Kozicz T, Witters P, Morava E (2019) Therapeutic approaches in Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) involving N-linked glycosylation: an update. *Genet Med* [https://doi: 10.1038/s41436-019-0647-2](https://doi.org/10.1038/s41436-019-0647-2)
7. Makhamreh MM, Cottingham N, Ferreira CR, Berger S, Al-Kouatly HB (2019) Nonimmune hydrops fetalis and congenital disorders of glycosylation: A systematic literature review. *J Inher Metab Dis* [https://doi: 10.1002/jimd.12162](https://doi.org/10.1002/jimd.12162)
8. Jaeken J, Pirard M, Adamowicz M, Pronicka E, van Schaftingen E (1996) Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose 1-phosphate: an explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance. *Pediatr Res* 40: 764-766
9. Suzuki T, Huang C, Fujihira H (2016) The cytoplasmic peptide: N-glycanase (NGLY1) – Structure, expression and cellular functions. *Gene* 577: 1-7
10. Hirayama H, Hosomi A, Suzuki T (2015) Physiological and molecular functions of the cytosolic peptide: N-glycanase. *Semin Cell Dev Biol* 41: 110-120
11. Stypulkowska A, Zwierz P, Zwierz K (2004) Endoglikozydazy i glikoamidazy. *Post Biochem* 50: 82-88
12. Lam C, Wolfe L, Need A, Shashi V, Enns G (2018) NGLY1-Related Congenital Disorder of Deglycosylation, W: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A (red) *GeneReviews*® University of Washington, Seattle, str. 1993-2019
13. Suzuki T, Harada Y (2014) Non-lysosomal degradation pathway for N-linked glycans and dolichol-linked oligosaccharides. *Biochem Biophys Res Commun* 453: 213-219
14. Huang C, Harada Y, Hosomi A, Masahara-Negishi Y, Seino J, Fujihira H, Funakoshi Y, Suzuki T, Dohmae N, Suzuki T (2015) Endo- β -N-acetylglucosaminidase forms N-GlcNAc protein aggregates during ER-associated degradation in Ngly1-defective cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 1398-403
15. Need AC, Shashi V, Hitomi Y, Schoch K, Shianna KV, McDonald MT, Meisler MH, Goldstein DB (2012) Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J Med Genet* 49: 353-361
16. Lipiński P, Bogdańska A, Rózdżyńska-Świątkowska A, Wierzbicka-Rucińska A, Tyłki-Szymańska A (2020) NGLY1 deficiency: Novel pa-

- tient, review of the literature and diagnostic algorithm. *JIMD Rep* (in press). <https://doi.org/10.1002/jmd2.12086>
14. Enns GM, Shashi V, Bainbridge M, Gambello MJ, Zahir FR, Bast T, Crimian R, Schoch K, Platt J, Cox R, Bernstein JA, Scavina M, Walter RS, Bibb A, Jones M, Hegde M, Graham BH, Need AC, Oviedo A, Schaaf CP, Boyle S, Butte AJ, Chen R, Chen R, Clark MJ, Haraksingh R; FORGE Canada Consortium, Cowan TM, He P, Langlois S, Zoghbi HY, Snyder M, Gibbs RA, Freeze HH, Goldstein DB (2014) Mutations in *NGLY1* cause an inherited disorder of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Genet Med* 16: 751-758
 15. Heeley J, Shinawi M (2015) Multi-systemic involvement in *NGLY1*-related disorder caused by two novel mutations. *Am J Med Genet A* 167A: 816-820
 16. Caglayan AO, Comu S, Baranoski JF, Parman Y, Kaymakçalan H, Akgumus GT, Caglar C, Dolen D, Erson-Omay EZ, Harmanci AS, Mishra-Gorur K, Freeze HH, Yasuno K, Bilguvar K, Gunel M (2015) *NGLY1* mutation causes neuromotor impairment, intellectual disability, and neuropathy. *Eur J Med Genet* 58: 39-43
 17. Lam C, Ferreira C, Krasnewich D, Toro C, Latham L, Zein WM, Lehky T, Brewer C, Baker EH, Thurm A, Farmer CA, Rosenzweig SD, Lyons JJ, Schreiber JM, Gropman A, Lingala S, Ghany MG, Solomon B, Macnamara E, Davids M, Stratakis CA, Kimonis V, Gahl WA, Wolfe L (2017) Prospective phenotyping of *NGLY1*-CDDG, the first congenital disorder of deglycosylation. *Genet Med* 19: 160-168
 18. Hall PL, Lam C, Alexander JJ, Asif G, Berry GT, Ferreira C, Freeze HH, Gahl WA, Nickander KK, Sharer JD, Watson CM, Wolfe L, Raymond KM (2018) Urine oligosaccharide screening by MALDI-TOF for the identification of *NGLY1* deficiency. *Mol Genet Metab* 124: 82-86
 19. Van Keulen BJ, Rotteveel J, Finken MJ (2019) Unexplained death in patients with *NGLY1* mutations may be explained by adrenal insufficiency. *Physiol Rep* 7: e13979
 20. Cahan EM, Frick SL (2019) Orthopaedic phenotyping of *NGLY1* deficiency using an international, family-led disease registry. *Orphanet J Rare Dis* 14: 148
 21. Haijes HA, De Sain-van der Velden MGM, Prinsen HCMT, Willems AP, Van der Ham M, Gerrits J, Couse MH, Friedman JM, Van Karnebeek CDM, Selby KA, Van Hasselt PM, Verhoeven-Duifin NM, Jans JJM (2019) Aspartylglycosamine is a biomarker for *NGLY1*-CDDG, a congenital disorder of deglycosylation. *Mol Genet Metab* 127: 368-372
 22. Chang CA, Wei X, Martin SR, Sinasac DS, Al-Hertani W (2019) Transiently elevated plasma methionine, S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine: Unreported laboratory findings in a patient with *NGLY1* deficiency, a congenital disorder of deglycosylation. *JIMD Rep* 49: 21-29
 23. www.science.org
 24. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J (2011) Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 12: 745-755

Congenital disorder of deglycosylation associated with N-glycanase 1 deficiency

Patryk Lipiński, Anna Tylki-Szymańska 

Department of Pediatrics, Nutrition and Metabolic Disease, The Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, Dzieci Polskich 20 Av, 04-730 Warsaw, Poland

 Corresponding author: atylki@ipczd.pl

SUMMARY

Together with the lysosomal storage diseases, N-glycanase 1 deficiency is a congenital disorder of deglycosylation, which has been diagnosed in 27 patients, including two of them from Poland. The pathogenesis remains unknown, however, the main role is attributed to the disturbed endoplasmic reticulum-associated protein degradation process. The most characteristic symptoms include global developmental disability, hyperkinetic movement disorder, hypo-/alacrimia, and elevated serum transaminases. Identification of pathogenic variants in the *NGLY1* gene is required to confirm the diagnosis.

Key words: glycosylation, congenital disorders of glycosylation, N-glycanase 1, deglycosylation, congenital disorders of deglycosylation